

© Коллектив авторов, 2006

Д. В. Кравченко¹, Я. А. Иваненков¹, К. В. Балакин¹, В. М. Кисиль²,
С. Е. Ткаченко², И. М. Окунь², А. В. Иващенко^{1, 2}

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НОВЫХ НЕПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ КАСПАЗЫ-3

¹ Исследовательский институт химического разнообразия (ИИХР),
Химки, М. О., Россия, dk@chemdiv.com

² ХемДив, Инк, Сан Диего, США, av@chemdiv.com

В работе описаны процедуры компьютерного (виртуального) и реального высокопроизводительного биологического скрининга библиотек производных хинолина, приведшие к открытию нового структурного класса ингибиторов каспазы-3. Указанный фермент, относящийся к группе цистеиновых протеаз, является перспективной терапевтически значимой биомшенью, вовлеченной в развитие ряда патологических состояний в организме человека. Методология виртуального скрининга основана на оценке мишень-специфического профиля соединений при помощи специального алгоритма анализа мультипараметрических данных (самоорганизующиеся карты Кохонена). Применение этого метода позволило провести направленную селекцию соединений для синтеза. Биологический скрининг синтезированных веществ привел к открытию новых эффективных ингибиторов каспазы-3. Наиболее активные соединения обладают активностью в диапазоне IC₅₀ 4 – 30 нМ. Непептидная природа указанного хемотипа способствует потенциально благоприятным фармакокинетическим параметрам, а принадлежность к большим библиотекам, полученным при помощи методов параллельного комбинаторного синтеза в растворе, способствует последующей оптимизации активных соединений.

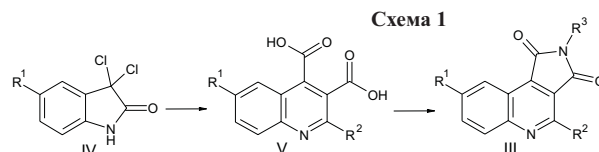
Программируемая клеточная смерть, или апоптоз, представляет собой многостадийный процесс освобождения многоклеточных организмов от поврежденных и старых клеток [1, 2]. Применительно к клеткам животных и человека апоптоз в большинстве случаев связан с протеолитической активацией каскада каспаз — семейства эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки вблизи остатков аспарагиновой кислоты [3 – 6]. По принципу структурной гомологии каспазы подразделяются на подсемейства: а) каспазы-1 (каспазы 1, 4, 5), б) каспазы-2 (каспаза-2) и в) каспазы-3 (каспазы-3, 6 – 10). В настоящее время каспазы рассматриваются как перспективные биомшени для действия лекарственных препаратов. Например, такие препараты как Пралнакасан [7], NO-урсодезоксихолевая кислота [8] и VRT-18858 [7], являющиеся ингибиторами этих ферментов, достигли различных стадий клинических испытаний. Целый ряд соединений находится в настоящее время на этапе предклинических испытаний в качестве средств для терапии опухолевых и нейродегенеративных заболеваний (см., например, недавние обзоры [9 – 12]). Ингибирование активности каспазы-3 играет важную роль в нейропротекторном [13] и кардиопротекторном эффектах [14]. Кроме того, ингибиторы каспазы-3 являются перспективными противодартритными препаратами [15]. Низкомолекулярным ингибиторам каспазных ферментов посвящен ряд обзорных работ [16, 17].

Целью настоящей работы явился направленный синтез, дизайн и оценка *in vitro* активности по отноше-

нию к каспазе-3 ряда новых производных хинолиново-го гетероцикла I – III (рис. 1).

Экспериментальная химическая часть

Разработанная нами методика синтеза 6-сульф-амидных производных 2-оксо-1,2-дигидрохинолина I (рис. 1) основана на трансформации незамещенного изатина в 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-этилкарбоксилат по реакции Пфитцингера [18]. Целевые продукты получали путем последующего сульфохлорирования и образования соответствующих сульфамидных и карбоксамидных производных путем реакции с первичными и вторичными аминами [19]. Недавно обнаруженное в наших предыдущих работах альтернативное направление реакции Пфитцингера с использованием в качестве исходного реагента 5-сульфамоилизатина позволило получить ранее неизвестные производные хинолина II [20]. Предложенная в работе [21] стратегия синтеза 1,3-диоксо-2,3-дигидропиролло[3,4-с]хинолинов III приведена на схеме 1.



Хинолин-3,4-дикарбоновые кислоты II были получены путем взаимодействия исходного 3,3-дихлор-2-оксоиндолина IV с различными кетоэфирми, что позволило получить соединения V, содержащие

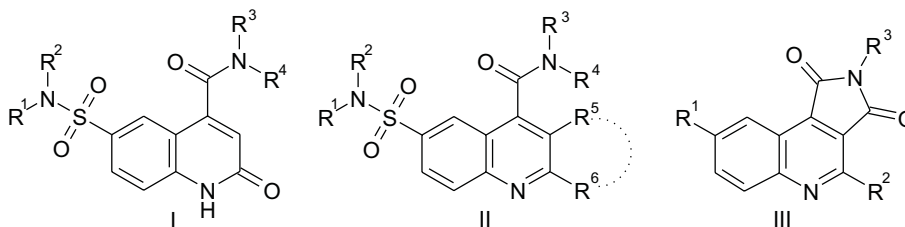


Рис. 1. Общие структуры синтезированных в работе соединений

алкильные, амидные и сульфонамидные заместители в положении 2 (R^2). Для увеличения функционального разнообразия наряду с незамещенным индолином IV ($R^1 = H$) использовались его галоген-, нитрил- и сульфонильные производные [21]. Взаимодействие дикарбоновой кислоты V с ацетальдегидом приводит к формированию 8-замещенных 1,3-диоксофуоро[3,4-с]хинолинов, которые по реакции с первичными и вторичными аминами удалось эффективно трансформировать в соответствующие имидные производные 1,3-диоксо-2,3-дигидропирролло[3,4-с]хинолина III (выход 80 – 92 %).

Экспериментальная биологическая часть

Ингибирующую способность синтезированных хинолиновых производных серии III (схема 1) по отношению к каспазе-3 исследовали с использованием субстрата каспазы-3 [Ac-DEVD], модифицированного флуорофорной меткой — 7-амино-4-метилкумарином (AMC) [22]. Сравнительный анализ активности проводился в присутствии потенциального ингибитора (тестируемое соединение) и без него в соответствии с экспериментальным протоколом, описанным в работе [24] с использованием прибора VICTOR²V (PerkinElmer). Каспазу-3 (10 пмоль) добавляли в пробирки объемом 200 мкл, содержащие NaOAc (50 ммоль/л, pH 6,2), глицерин (10 %), ЭДТА (0,25 ммоль/л), буфер HEPES (5 ммоль/л, pH 7,5), KCl (50 мкмоль/л) и Ac-DEVD-AMC (10 мкмоль/л). Тестируемые соединения растворяли в ДМСО и затем вносили в указанный раствор таким образом, чтобы концентрация ДМСО не превышала 5 %. Далее определяли интенсивность флуоресценции AMC, высвобождающегося в результате расщепления комплекса [Ac-DEVD-AMC] под действием каспазы-3. Изначально все соединения были испытаны при концентрации 50 мкмоль/л. Для

соединений, проявивших активность, были дополнительно проведены эксперименты по измерению величины IC_{50} . Результат рассчитывали как среднее от трех независимых измерений.

Экспериментальная расчетная часть

Методология, при помощи которой были отобраны соединения для начального этапа биологических испытаний, основана на построении классификационных КССА-моделей при помощи алгоритма самоорганизующихся карт Кохонена [25]. Этот алгоритм относится к нейронно-сетевым методам снижения размерности многомерных пространств свойств исследуемых объектов (в данном случае объектами являются структуры соединений, а свойствами — расчетные молекулярные параметры, дескрипторы). Он является удобным средством визуального анализа количественных связей между расчетными параметрами молекул и их биологической активностью, поскольку позволяет создавать двухмерные отображения многомерных пространств свойств. К некоторым недостаткам этого метода относятся возможные неточности при воспроизведении топологического расстояния между объектами в многомерных пространствах свойств и высокие требования к компьютерным ресурсам. Используемый нами метод позволяет в рамках одной КССА модели предсказывать эффективность связывания не с одной, а с целым рядом терапевтически значимых биологических мишеней. Теоретическим и практическим аспектам использованной методологии посвящен ряд публикаций [26 – 30]. В качестве обучающей выборки была использована база данных, состоящая из 18703 соединений с экспериментально показанной активностью, включая лекарственные субстанции, а также соединения, находящиеся на стадии клинических или доклинических испыта-

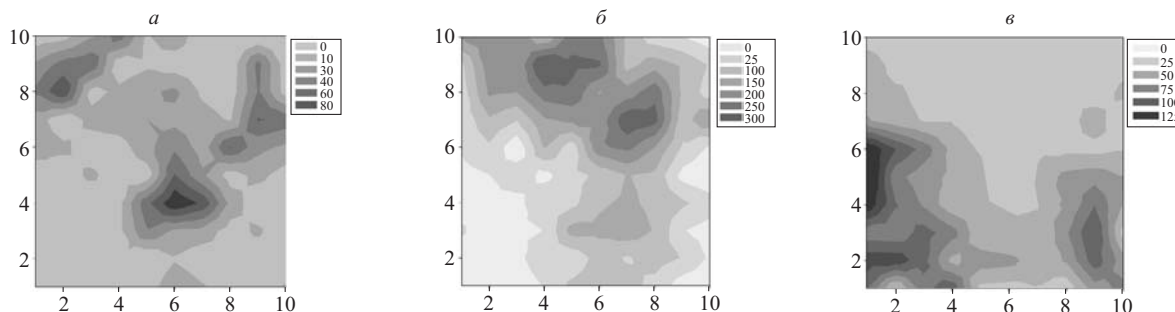


Рис. 2. Области распределения мишень специфичных групп активных соединений на карте Кохонена: (а) ингибиторы тирозинкиназ (1400 соединений); (б) модуляторы GPCR (12660 соединений); (в) ингибиторы протеаз (2833 соединений)

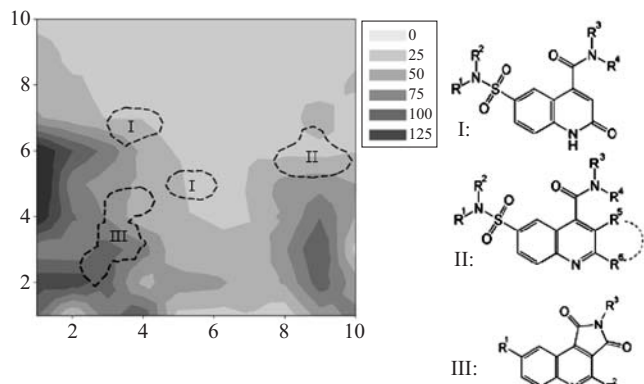


Рис. 3. Положение комбинаторных библиотек I – III (пунктирные линии) на фоне зон распределения известных ингибиторов протеаз

ний. Каждое соединение было отнесено к одной из пяти групп по типу мишень-специфичного действия на следующие фармакологически значимые биомишени: 1) рецепторы, связанные с G-белками, 2) тирозинкиназы, 3) ион-канальные рецепторы, 4) протеазные ферменты, 5) фосфодиэстеразы. Все структуры были взяты из коммерчески доступной базы данных Prous Ensemble [31]. Для каждого соединения были рассчитаны пять молекулярных дескрипторов, которые в дальнейшем использовались для моделирования: MW (молекулярная масса), log P (логарифм коэффициента распределения 1-октанол/вода), HBD и HBA (число доноров и акцепторов водородной связи), Rot_B (число вращающихся связей).

Для полной обучающей базы была построена карта Кохонена (10 × 10). Обучение модели проводилось независимо от классификации соединений (неконтролируемое обучение), что составляет главное отличие данного алгоритма от более часто используемых методов контролируемого обучения. После построения модели были определены положения отдельных групп соединений, соответствующие пяти мишень-специ-

фичным активностям. Все вычисления были произведены с помощью оригинального программного комплекса, разработанного в ИИХР, на стандартной персональной рабочей станции (ЦПУ PIV с тактовой частотой 1,4 ГГц, 512 Мб оперативной памяти) на платформе операционной системы Windows 2000.

Результаты и их обсуждение

Рассчитанные дескрипторы относятся к классическим в области КССА-анализа. Они напрямую связаны с такими важными свойствами молекулы, как размер, липофильность, конформационная подвижность, способность к образованию водородных связей. Эти параметры пригодны для оценки широкого круга фармакокинетических свойств соединений, а также для предсказания специфичной активности [32, 27]. Немаловажными обстоятельствами являются простота, высокая скорость и однозначность их вычисления.

Карты Кохонена представляют собой мощный инструмент для анализа и визуализации больших массивов данных, позволяющий создавать двух- или трехмерные отображения многомерных пространств свойств. Этот метод находит все более широкое применение в различных областях разработки лекарственных препаратов, включая анализ специфичных биологических активностей [33 – 35]. Соединения, расположенные в непосредственной близости друг от друга на карте Кохонена, являются близкими соседями и в пятимерном пространстве.

После построения общей карты (модели) мы поочередно выявили области локализации на ней каждой из пяти исследуемых мишень-специфичных групп, три из которых представлены на рис. 2. Очевидно, что наблюдаются заметные различия в положениях соединений из этих групп. Например, зона соединений, активных по отношению к GPCR (рис. 2, б), почти не пересекается с зоной ингибиторов протеазных ферментов (рис. 2, в). Непосредственным выводом, который можно сделать на основании полученных результатов, яв-

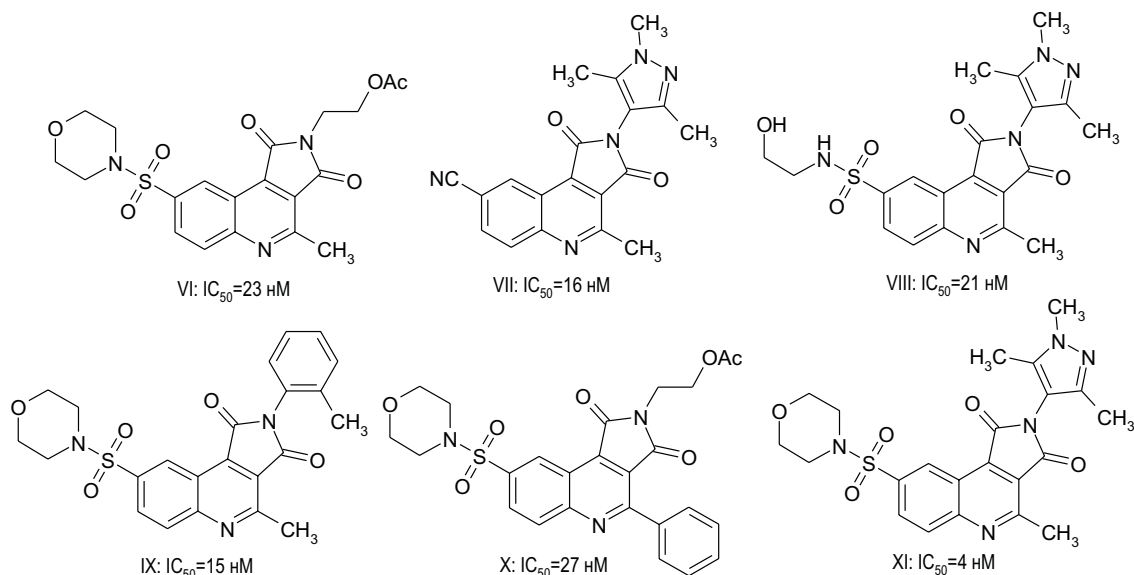


Рис. 4. Примеры наиболее активных соединений по отношению к каспазе-3 из комбинаторной библиотеки III

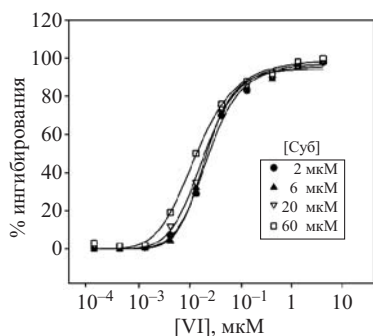


Рис. 5. Концентрационные кривые ингибирования каспазы-3

ляется наличие в исследуемом пятимерном пространстве физико-химических свойств компактных регионов, соответствующих определенным мишень-специфичным активностям. В результате этого построенная карта Кохонена способна уловить различия в положении различных групп активных соединений.

Найденные закономерности размещения мишень-специфичных групп использовались для приоритизации исследуемых соединений для биологических испытаний с целью выявления их активности по отношению к каспазам. Методология профилирования состоит из расчета для каждого из 1233 синтезированных соединений из библиотек I – III (рис. 1) пяти дескрипторов, аналогичных использованным для построения модели, и последующего определения положения каждого соединения на карте Кохонена в режиме тестирования модели. На рис. 3 показан пример распределения соединений, принадлежащих комбинаторным библиотекам I – III, на фоне области, характерной для ингибиторов протеаз.

Так, например, очевидно, что библиотека III практически полностью попадает в область, типичную для ингибиторов протеаз. Соединения из библиотеки II в незначительной степени перекрываются с желаемой областью, однако их с некоторой долей вероятности (несколько меньшей, чем у библиотеки III) можно отнести именно к ингибиторам протеаз, поскольку в этой зоне на карте практически нет соединений, принадлежащих другим мишень-специфичным группам. Напротив, соединения из библиотеки I, образующие на карте два компактных кластера, обладают другим типом активности. В частности, их можно отнести к ингибиторам тирозинкиназ (рис. 2, а). Отметим, что области на карте, соответствующие различным мишень-специфичным профилям активности, могут довольно существенно перекрываться, и во многих случаях можно прогнозировать несколько различных активностей.

На основании проведенных исследований для биологических испытаний была выбрана библиотека III, для которой можно прогнозировать протеазную активность. Действительно, по результатам первичного биологического скрининга по отношению к каспазе-3 удалось выявить серию активных соединений, некоторые из которых представлены на рис. 4. Определение параметра IC_{50} , характера и константы ингибирования (на примере соединения VI (рис. 4)) проводилось на

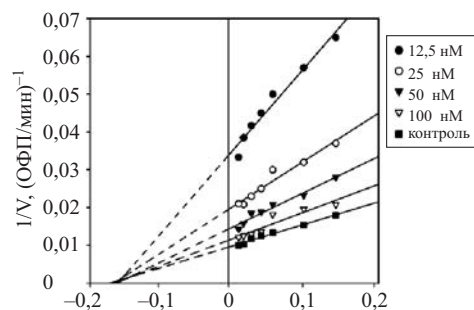
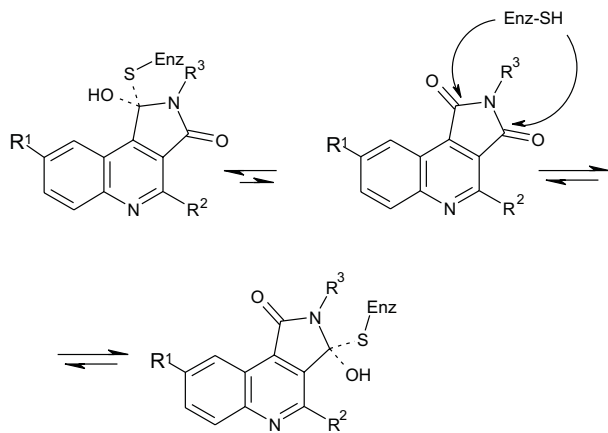


Рис. 6. Прямые Лайнуивера-Бэрка

основании экспериментально полученных концентрационных кривых ингибирования (рис. 5) и с помощью линейного преобразования Лайнуивера-Бэрка (рис. 6).

Из рис. 5 видно, что IC_{50} для соединения VI составляет 23 ± 6 нМ и практически не зависит от концентрации каспазного субстрата ([Суб]), что говорит о неконкурентном характере ингибирования. Наиболее активные соединения обладают активностью в диапазоне IC_{50} 4 – 30 нМ (рис. 4). Параллельные контрольные эксперименты показали, что найденный в аналогичных условиях параметр IC_{50} для одного из наиболее активных описанных ингибиторов каспазы-3, тетрапептида DEVD-СНО, равен 3 нМ.

Было установлено, что одним из основных структурных факторов, определяющих степень ингибирующей активности, является природа заместителя в положении 4 (R^2) структуры III (рис. 1). Наиболее активные соединения содержат простые алкильные и арильные группы, а менее активные — гидроксил- и аминоксодержащие группы. В общем случае повышение нуклеофильности заместителя в положении 4 влечет за собой понижение электрофильности карбонильных групп пиррольного фрагмента в 1,3-диоксо-2,3-дигидропирролло[3,4-с]хинолинах и, как следствие, уменьшение активности. Кроме того, нам удалось выяснить, что природа заместителя в положении 8 (R^1) структуры III также существенным образом влияет на активность. Наличие в этом положении сульфамидной группы, а также ее ближайших структурных аналогов или заместителей, обладающих схожими электрон-акцепторными свойствами, непосредственно связано с высокой ингибирующей способностью. Предположительно, именно электронная природа заместителя в положении 8 оказывает непосредственное влияние на энергию делокализации π -сопряженной хинолиновой системы и электрофильность пиррольного фрагмента, которая в свою очередь определяет степень активности по отношению к каспазе-3. Происходит это в основном за счет перераспределения электронной плотности, обусловленного отрицательным (M^-) и положительным (M^+) мезомерными эффектами, а также, хотя и в меньшей степени, за счет эффекта гиперконъюгации [36]. На основании известного механизма ингибирования каспаз соединениями, содержащими электрофильные карбонильные фрагменты [37, 38], мы можем предположить аналогичный механизм ингибирования для соединений из синтезированной библиотеки III:



Из экспериментальных данных удалось выяснить, что природа заместителя R³ оказывает значительно меньшее влияние на активность. Предположительно, оно в большей степени связано с пространственным и стабилизационным эффектами.

Таким образом, в настоящей работе описана многостадийная схема открытия новых биологически активных соединений, ингибиторов протеолитических ферментов. Она включает в себя компьютерную селекцию соединений с использованием КССА-моделирования, синтез и биологические испытания. В результате найдены эффективные ингибиторы каспазы-3, обладающие терапевтическим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. N. B. Blatt and G. D. Glick, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1371 – 1384 (2001).
2. D. D. Newmeyer, S. Ferguson-Miller, *Cell*, **112**, 481 – 490 (2003).
3. G. M. Cohen, *Biochem. J.*, **326**, 1 – 16 (1997).
4. N. A. Thornberry and Y. Lazebnik, *Science*, **281**, 1312 – 1316 (1998).
5. М. П. Куцый, Е. А. Кузнецова, А. И. Газиев, *Биохимия*, **64**(2), 115 – 126 (1999).
6. V. J. Kidd, *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 533 – 573 (1998).
7. K. Rudolph, N. Gerwin, N. Verzijl, et al., *Osteoarthritis Cartilage*, **11**(10), 738 – 46 (2003).
8. S. Fiorucci, A. Mencarelli, B. Palazzetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(5), 2652 – 2657 (2001).
9. D. A. Fennell, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2097 – 2105 (2005).
10. M. Mita and A. W. Tolcher, *Curr. Probl. Cancer*, **29**(1), 8 – 32 (2005).
11. A. D. Schimmer, *Cancer Res.*, **64**, 7183 – 7189 (2004).

12. D. H. Cribbs, W. W. Poon, R. A. Rissman, and M. Blurton-Jones, *Am. J. Pathol.*, **165**(2), 353 – 355 (2004).
13. B. A. McLaughlin, K. A. Hartnett, J. A. Erhardt, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 715 – 720 (2003).
14. J. G. Chapman, W. P. Magee, Stukenbrok, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **456**(1 – 3), 59 – 68 (2002).
15. D. Lee, S. A. Long, J. H. Murray, et al., *J. Med. Chem.*, **44**(12), 2015 – 2026 (2001).
16. N. O. Concha and S. S. Abdel-Meguid, *Curr. Med. Chem.*, **9**, 713 – 726 (2002).
17. R. V. Talanian, K. D. Brady, and V. L. Cryns, *J. Med. Chem.*, **43**(18), 3351 – 3371 (2000).
18. W. Pfitzinger, *J. Prakt. Chem.*, **33**, 100 (1886).
19. A. V. Ivachtchenko, V. V. Kobak, A. P. Ilyn, et al., *J. Comb. Chem.*, **7**(2), 227 – 235 (2005).
20. A. V. Ivachtchenko, A. V. Khvat, V. V. Kobak, et al., *Tetrahedron Lett.*, **45**(28), 5473 – 5476 (2004).
21. D. V. Kravchenko, V. V. Kysil, A. P. Ilyn, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**(7), 1841 – 1845 (2005).
22. D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry, et al., *Nature*, **376**(6535), 37 – 43 (1995).
23. M. Garcia – Calvo, E. P. Peterson, D. M. Rasper, et al., *Cell. Death. Differ.*, **6**(4), 362 – 369 (1999).
24. F. Durrieu, F. Belloc, L. Lacoste, et al., *Exp. Cell. Res.*, **240**(2), 165 – 175 (1998).
25. J. B. Kruskal, *Phychometrika*, **29**, 115 – 129 (1964).
26. Y. Nikolsky, K. V. Balakin, Y. A. Ivanenkov, et al., *Pharma Chem.*, **4**, 68 – 72 (2003).
27. K. V. Balakin, *Modern Drug Disc.*, **9**, 45 – 47 (2003).
28. Y. A. Ivanenkov, K. V. Balakin, A. V. Skorenko, et al., *Chemistry Today*, **21**, 72 – 75 (2003).
29. N. P. Savchuk and K. V. Balakin, in: *Virtual Screening in Drug Discovery*, H. Alvarez and B. Shoichet (eds.), CRC Press, New York (2005), pp. 121 – 149.
30. N. P. Savchuk, S. E. Tkachenko, and K. V. Balakin, in: *Cheminformatics in Drug Discovery*, T. Oprea (ed.), Wiley VCH, Weinheim (2005), pp. 287 – 313.
31. <http://www.prous.com>.
32. K. V. Balakin, S. Ekins, A. Bugrim, et al., *Drug. Metab. Dispos.*, **32**(10), 1183 – 1189 (2004).
33. M. Brustle, B. Beck, T. Schindler, et al., *J. Med. Chem.*, **45**(16), 3345 – 3355 (2002).
34. S. Anzali, G. Barnickel, M. Krug, et al., *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **10**(6), 521 – 534 (1996).
35. A. A. Rabow, R. H. Shoemaker, E. A. Sausville, and D. G. Covell, *J. Med. Chem.*, **45**, 818 – 840 (2002).
36. F. M. Dean, *J. Chem. Soc.*, **22**, 2444 – 2452 (1976).
37. S. E. Webber, J. Tikhe, S. T. Worland, et al., *J. Med. Chem.*, **39**(26), 5072 – 5082 (1996).
38. Q. M. Wang, R. B. Johnson, L. N. Jungheim, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**(4), 916 – 920 (1998).

Поступила 19.04.05

DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW NONPEPTIDE CASPASE-3 INHIBITORS

D. V. Kravchenko^{1*}, Ya. A. Ivanenkov¹, K. V. Balakin¹, V. M. Kisil², S. E. Tkachenko², I. M. Okun², and A. V. Ivashchenko^{1,2}

¹ Institute of Chemical Diversity Research, Khimki, Moscow oblast, Russia;

² ChemDiv Inc., San Diego, CA, USA

* e-mail: dk@chemdiv.com

Highly effective computer-aided (virtual) and real biological screening over quinoline derivatives is described, which has led to the discovery of a new structural class of caspase-3 inhibitors. This enzyme (belonging to the group of cysteine proteases) is a promising therapeutically-significant biological target that is involved in the development of various pathological states in the human organism. The virtual screening method is based upon evaluation of a target-specific profile of compounds by means of a special algorithm intended for the analysis of multiparametric data arrays (self-organizing Kohonen maps). Using this approach, it is possible to carry out targeted selection of compounds for the synthesis. The biological screening led to a series of new effective inhibitors of caspase-3, the most active of which possess effective inhibiting concentrations in the range of IC₅₀ = 4 – 30 nM. The nonpeptide nature of the new chemotype offers potentially favorable pharmacokinetic parameters, while the belonging to large libraries (obtained by means of the parallel combinatorial synthesis in solution) facilitates the subsequent optimization of active compounds.